

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> : <b>A61K 9/51</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 93/25195</b> (43) Date de publication internationale: 23 décembre 1993 (23.12.93)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00594 (22) Date de dépôt international: 16 juin 1993 (16.06.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/07287 16 juin 1992 (16.06.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75007 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SKIBA, Mohamed [MA/FR]; 12, chemin des Hauts-Graviers, F-91370 Verrières-le-Buisson (FR). WOUESSIDJEW, Denis [CM/FR]; 90 B, avenue François-Molé, F-92160 Antony (FR). COLEMAN, Antony [GB/FR]; 13, rue Machelard, F-91640 Briis-sous-Forges (FR). FESSI, Hatem [TN/FR]; 3, rue Friant, F-75014 Paris (FR). DEVISSAGUET, Jean-Philippe [FR/FR]; 14, boulevard d'Inkermann, F-92200 Neuilly-sur-Seine (FR). DUCHENE, Dominique [FR/FR]; 8 bis, rue Laurent-Pichat, F-75116 Paris (FR). PUISIEUX, Francis [FR/FR]; 66, rue de Strasbourg, F-94700 Maisons-Alfort (FR).</p>		<p>(74) Mandataire: LE GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR). (81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: PREPARATION AND USE OF NOVEL CYCLODEXTRIN-BASED DISPERSIBLE COLLOIDAL SYSTEMS IN THE FORM OF NANOSPHERES</p>		
<p>(54) Titre: PREPARATION ET UTILISATION DE NOUVEAUX SYSTEMES COLLOIDaux DISPERSIBLES A BASE DE CYCLODEXTRINE, SOUS FORME DE NANOSPHERES</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>A nanoparticulate system prepared by: 1) preparing a liquid phase essentially consisting of a solution of cyclodextrin modified by acyl groups in an organic solvent or solvent mixture, an active molecule being optionally added thereto; 2) preparing a second liquid phase essentially consisting of water or an aqueous mixture optionally containing one or more surfactants, and optionally having an active molecule added thereto; and 3) gently stirring one of the liquid phases resulting from 1) or 2) into the other in order to obtain, almost instantaneously, a colloidal solution of modified cyclodextrin nanospheres. If required, all or part of the solvent and all or part of the water may be removed. Said system may be used as a carrier for pharmaceuticals, cosmetics, chemicals, etc.</p>		
<p>(57) Abrégé</p> <p>La préparation du système nanoparticulaire est caractérisée selon l'invention en ce que: 1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de cyclodextrine modifiée par des groupes acyle dans un solvant ou un mélange de solvants organique(s), et pouvant être additionnée d'une molécule active; 2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par de l'eau ou un mélange aqueux, pouvant contenir un ou plusieurs surfactifs, et pouvant être additionnée d'une molécule active; 3) on ajoute sous agitation modérée, l'une des phases liquides obtenues sous 1) ou 2) à l'autre de manière à obtenir pratiquement instantanément une suspension colloïdale de nanosphères de cyclodextrine modifiée. Le cas échéant on élimine tout ou partie du solvant et de l'eau. Applications: vecteurs de produits chimiques, pharmaceutiques, cosmétiques, etc.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

- 1 -

"Préparation et utilisation de nouveaux systèmes colloïdaux dispersibles à base de cyclodextrine, sous forme de nanosphères"

La présente invention a pour objet la préparation et l'application d'un nouveau système colloïdal dispersible à base de cyclodextrine sous forme de particules sphériques de type matriciel et de taille  
5 allant de 90 à 900 nm (nanosphères), pouvant contenir une molécule active.

Des particules submicroniques sont déjà connues notamment d'après BE-A-808 034, BE-A-839 748, BE-A-869 107, FR-A-2 504 408, EP-A-02 75 796 et EP-A-03 49  
10 428.

Ainsi, les brevets belges n°808 034 et 839 748 décrivent des particules submicroniques formées de matières polymérisables comme les dérivés de l'acide acrylique ou méthacrylique par exemple le méthacrylate de méthyle ou de butyle, le méthacrylamide ou un mélange  
15 de ces composés. Les particules submicroniques formées par polymérisation micellaire de ces différents monomères ont à la fois la propriété d'enrober totalement ou partiellement la substance biologiquement active et la  
20 propriété de former des suspensions aqueuses colloïdales qui permettent une administration parentérale de ces particules ainsi chargées de molécules biologiquement actives.

Cependant, les polymères de dérivés de  
25 l'acide acrylique ou méthacrylique décrits dans ces brevets pour la préparation de particules submicroniques, contenant une molécule biologiquement active, sont substantiellement stables de sorte qu'ils subsistent longtemps tels quels dans les tissus ou dans la cavité  
30 où ils ont été administrés et ceci constitue un inconvénient, plus particulièrement dans le cas d'administration parentérale en médecine humaine.

Le brevet belge n°869 107 remédie à ce

désavantage en décrivant des nanoparticules biodégradables contenant une molécule biologiquement active. Le matériau utilisé est constitué par des polymères de cyanoacrylate d'alkyles déjà utilisés en chirurgie comme adhésifs tissulaires et connus pour leur biodégradabilité.

Son inconvénient majeur tient à la structure des particules obtenues, à la toxicité des produits de dégradation et au mode d'incorporation de la substance active. Le mode opératoire décrit permet seulement de préparer des particules formées d'un réseau polymérique très dense. La molécule active ne peut être incorporée que par adsorption et le taux fixé est toujours relativement faible. De plus il est difficile de maîtriser le poids moléculaire du polymère constitutif des nanoparticules et il est nécessaire, notamment en vue d'usages biologiques, d'éliminer des monomères et oligomères résiduels, le cas échéant les réactifs de polymérisation (initiateur et catalyseur) en excès ainsi que les surfactifs s'ils sont utilisés à forte concentration ou s'ils ne sont pas biocompatibles. Or, la purification (ultracentrifugation, dialyse) s'avère souvent lourde car la filtration des nanoparticules, vu leur taille, n'est pas toujours possible.

On a aussi proposé des nanoparticules à base de protéines, notamment par dénaturation à chaud d'une émulsion eau dans l'huile d'une solution protéique telle que l'albumine, (Kramer, P.A : J.Pharm.Sci., 63 1646, 1974) ou par désolvatation d'une solution protéique, telle que la gélatine, par un sel minéral ou l'éthanol (Marty et coll., Austr. J.Pharm. Sci., 6, 65, 1978, ou Pharm. Acta Helv. 1, 53, 1978), puis, dans les deux cas, par durcissement au moyen d'un aldéhyde. Les nanoparticules selon Kramer ont pour inconvénient principal de nécessiter une émulsification préalable de la solution

aqueuse de la matière première macromoléculaire dans une phase continue huileuse. Cette émulsion devant être très fine, l'utilisation de surfactifs et d'appareillages ad-hoc (sonicateur, etc) est indispensable pour obtenir des nanoparticules de taille convenable. Quant aux nanoparticules selon Marty, elles font appel à des quantités importantes de sels minéraux qu'il faut éliminer, de même que l'excès d'aldéhyde et de sulfite ou de métabisulfite utilisés pour neutraliser ce dernier.

EP-A-02 75 796 et -03 49 428 décrivent des procédés d'obtention de nanoparticules d'une substance par une méthode de désolvatation consistant à mélanger deux phases de solvants, l'un étant non-solvant de la substance mais soluble dans l'autre solvant.

Les nanoparticules selon EP-A-03 49 428 sont préparées à certaines conditions c'est-à-dire, la température du solvant doit être inférieure à la température de coagulation de la protéine et le pH du non-solvant doit être éloigné du point isoélectrique de la protéine.

Selon la présente invention on propose comme matière de base des nanosphères, des cyclodextrines modifiées préparées par acylation de cyclodextrines naturelles. Elles ont l'avantage d'être biodégradables, leur administration est suivie d'une libération de la molécule active, et il est possible d'obtenir une biodégradabilité, convenablement programmée en faisant appel à des cyclodextrines modifiées différant entre elles par la nature de la chaîne alkyle du groupe acyle utilisé. De telles cyclodextrines modifiées et leur préparation sont notamment décrits par Ping Zhang, Chang-Chung Ling, A.W. Coleman, Parrot-Lopez et H.Galons dans Tetr. Lett. 32, N°24, 2769-70, 1991.

Ainsi l'invention a pour objet un procédé de

préparation d'un nouveau système colloïdal dispersible à base de cyclodextrine sous forme de nanosphères caractérisée en ce que :

1) on prépare une phase liquide constituée  
5 essentiellement par une solution de cyclodextrine modifiée par des groupes acyle dans un solvant ou mélange de solvants organique(s) contenant ou non un surfactif et pouvant être additionnée d'une molécule active,

2) on prépare une seconde phase liquide  
10 constituée essentiellement par de l'eau ou un mélange aqueux, contenant ou non un surfactif et pouvant être additionnée d'une molécule active, et

3) on ajoute sous agitation modérée, l'une  
15 des phases liquides obtenues sous (1) ou (2) à l'autre, de manière à obtenir pratiquement instantanément une suspension colloïdale de nanosphères de cyclodextrine modifiée contenant le cas échéant ladite molécule active.

Si l'on désire, on peut éliminer tout ou une  
20 partie du solvant ou du mélange de solvants et de l'eau ou du mélange aqueux, de manière à obtenir une suspension colloïdale de concentration voulue en nanosphères ou une poudre de nanosphères.

La cyclodextrine modifiée utilisée selon  
l'invention est notamment une cyclodextrine dont les  
25 groupes hydroxy, de préférence les hydroxy secondaires de chaque unité glucose la formant ont été estérifiés par un groupe acyle aliphatique ou aromatique pouvant être substitués par un ou plusieurs groupements fonctionnels, telle qu'une bêta-cyclodextrine acylée par un groupe  
30 alcanoyle de 2 à 20 atomes de carbone, notamment 6 à 14 atomes de carbone. Ces produits sont décrits par Ping Zhang et coll. précité.

La molécule active est ajoutée de préférence  
à la phase dans laquelle elle est soluble, notamment à  
35 la phase (1) si elle est liposoluble ou à la phase (2)

si elle est hydrosoluble.

La molécule active peut être un principe médicamenteux, un réactif biologique, un principe cosmétique, ou un produit chimique. L'invention permet  
5 d'obtenir des nanosphères de cyclodextrine modifiées seules (utilisables telles quelles) ou comprenant cette molécule active (emprisonnée dans sa structure).

Le solvant organique dans la phase (1) peut être un alcool tel que méthanol, éthanol, isopropanol,  
10 etc... ou une cétone telle que l'acétone.

L'eau ou un mélange aqueux (eau salée, acidifiée, alcalinisée, etc...) est le non-solvant dans la phase (2).

Le procédé peut être réalisé à différentes  
15 températures (qui influent peu sur son déroulement), notamment entre 0°C et la température d'ébullition des solvants. Le rapport des volumes phase (1)/phase (2) peut varier préférentiellement de 0,1 à 1.

Le(s) surfactif(s) est (sont) présent(s)  
20 notamment en une proportion de 0,1 à 10%, de préférence 0,2 à 2% en poids de la suspension colloïdale obtenue dans l'étape 3.

On entend par agitation modérée une agitation suffisante pour homogénéiser le mélange des phases (1)  
25 et (2), par exemple au moyen d'un barreau magnétique à 50-500 tr/min, par exemple 100 tr/min. Elle n'est pas indispensable pour de faibles quantités de produit.

Finalement, la suspension colloïdale de nanosphères peut être à volonté concentrée, stérilisée,  
30 tamponnée (par exemple au pH physiologique), et lyophilisée. Pour les sphères obtenues selon la présente invention, la préparation a l'avantage d'être réversible: on peut solubiliser les nanosphères et reconstituer les nanosphères à partir de cette solution suivant le mode  
35 opératoire. De plus les suspensions de nanosphères présentent une grande stabilité avec le temps.

Les nanosphères obtenues suivant l'invention

se présentent au microscope électronique à transmission, après coloration négative avec l'acide phosphotungstique, sous la forme de particules non contrastées sensiblement sphériques et, après cryofracture sous la forme de particules sphériques denses de type matriciel.

Selon les conditions opératoires, il est possible d'obtenir des nanosphères dont le diamètre varie d'environ 90 à environ 900 nanomètres, de préférence de 90 à 300 nm, notamment 150 à 300 nm.

Les nanosphères obtenues de l'invention peuvent contenir au sein de leur réseau une molécule active par exemple une molécule médicamenteuse à usage humain ou vétérinaire ou un produit pour le diagnostic. Comme molécule médicamenteuse, on peut citer plus particulièrement les produits chimiques doués de propriétés pharmacologiques et par exemple, les substances antimitotiques ou antinéoplasiques comme la méthotrexate, l'actinomycine D, l'adriamycine, la daunorubicine, la bléomycine, et la vincristine ou les substances antibiotiques comme les pénicillines, les céphalosporines et l'acide nalidixique, les antibiotiques du type aminoglycoside et ceux de la famille de la virginiamycine et les substances hormonales, notamment les hormones stéroïdiennes. Ces molécules médicamenteuses peuvent être notamment des composés chimiques à haut poids moléculaire comme l'insuline et l'héparine et l'expression "molécule médicamenteuse" comprend également des produits biologiques comme les antigènes, les enzymes, les protéines, les virus ou des constituants de virus, de bactéries ou de cellules. Les nanosphères suivant l'invention peuvent également contenir un produit pour le diagnostic comme par exemple la fluorescéine et la séralbumine humaine radio-active.

En médecine humaine ou vétérinaire, les nanosphères de l'invention peuvent être utilisés comme



vecteurs de médicaments administrés avec ou sans excipient adéquat par voie orale, sous cutanée, intradermique, intramusculaire ou intraveineuse et leur diffusion dans les tissus les rend particulièrement intéressantes pour les traitements par voie générale.

Les nanosphères de la présente invention, contrairement aux nanoparticules formées d'un réseau dense, présentent l'avantage de permettre un taux d'incorporation nettement plus élevé. Ceci est dû à la possibilité de double charge, en premier lieu, une charge dans le réseau et en second lieu dans la cavité de la cyclodextrine à condition que la molécule invitée ait une conformation convenable par rapport à la cavité.

L'invention est illustrée par les exemples suivants :

#### Exemple 1

Préparation de nanosphères de cyclodextrine modifiée à 6 carbone.

On utilise une bêta-cyclodextrine dont les OH secondaires des unités glucose la formant ont été extérifiés par des groupes hexanoyle, préparée selon Ping Zhang et coll.

#### Phase 1

bêta-cyclodextrine modifiée à 6 C	50 mg
acétone	50 ml

#### Phase 2

Pluronic (R) F68	62,5 mg
eau déminéralisée ou distillée	25 ml

La phase 1 est ajoutée sous agitation magnétique à la phase 2. Le milieu devient immédiatement opalescent par formation de nanosphères de cyclodextrine modifiée. La taille moyenne des nanosphères mesurée par un diffractomètre à rayon laser (Nanosizer (R) de chez Coultronics) est de 180 nm avec un indice moyen de

dispersion de 0,08.

La suspension peut être concentrée sous pression réduite au volume désiré, par exemple 5 ml ou plus ou moins.

5           Après un repos prolongé (14 mois), l'aspect de la suspension de nanosphères demeure inchangé et on n'observe, en particulier, ni sédimentation irréversible, ni variation de la taille des nanosphères.

10           **Exemple 2 :** (variante de l'exemple 1)

On procède comme dans l'exemple 1, mais en ajoutant la phase aqueuse à la phase acétonique. Les nanosphères obtenus présentent les mêmes caractéristiques que dans l'exemple 1.

15

**Exemple 3 :** (variante de l'exemple 1)

On procède comme dans l'exemple 1, mais en ajoutant la phase acétonique à la phase aqueuse sans agitation du milieu. Les nanosphères obtenues ont une  
20   taille de 200 nm avec un indice moyen de dispersion 0,5.

**Exemple 4 :** (variante de l'exemple 1)

On procède comme dans l'exemple 1, mais sans ajouter d'agent de surface à la phase aqueuse. Les  
25   nanosphères obtenues ont une taille de 200 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,6.

**Exemple 5**

30   Préparation stérile de nanosphères de cyclodextrine modifiée à 6 carbone. On procède comme dans l'exemple 1, puis la suspension est stérilisée à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes. La taille moyenne des particules demeure pratiquement inchangée après stérilisation.

35

**Exemple 6**

Préparation lyophilisée de nanosphères de cyclodextrine modifiée à 6 carbone.

On procède comme dans l'exemple 1, puis la suspension est lyophilisée. L'addition d'un cryoprotecteur (maltose, tréhalose...etc) n'est pas indispensable. La taille moyenne des particules mesurée juste après la lyophilisation demeure inchangée.

10

**Exemple 7**

Préparation de nanosphères de cyclodextrine modifiée à 12 carbone.

On procède comme dans l'exemple 1, en remplaçant la cyclodextrine modifiée à 6 carbone par la cyclodextrine modifiée à 12 carbone c'est-à-dire une beta-cyclodextrine acylée par des groupes dodecanoyle. La taille moyenne des nanosphères est de 172 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,1.

Ces nanosphères peuvent être stérilisées à l'autoclave et lyophilisées comme celles avec 6 carbone.

20

**Exemple 8**

Préparation de nanosphères de cyclodextrine modifiée à 14 carbone.

On procède comme dans l'exemple 1, en remplaçant la cyclodextrine modifiée à 6 carbone par la cyclodextrine modifiée à 14 carbone, c'est-à-dire acylée par des groupes tétradécanoyle. La taille moyenne des nanosphères est de 110 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,1.

30

Les nanosphères de cyclodextrine modifiée à 14 carbone peuvent être stérilisées à l'autoclave et lyophilisés comme celles avec 6 carbone.

35

**Exemple 9**

Stabilité des nanosphères de cyclodextrine en présence de forces ioniques variables.

On procède comme indiqué dans l'exemple 1.

- 5 Après concentration de la suspension de nanosphères de cyclodextrine modifiée jusqu'à un volume de 10 ml, on ajoute progressivement à celle-ci des quantités croissantes de chlorure de sodium. La suspension de nanosphères est parfaitement stable lorsque la concentration en
- 10 chlorure de sodium correspond à l'isotonie avec le sang et le demeure jusqu'à une concentration supérieure à 3 fois la concentration isotonique.

**Exemple 10**

- 15 Stabilité des nanosphères de cyclodextrine en présence d'un milieu acide ou basique.

On procède comme indiqué dans l'exemple 1.

- Après concentration de la suspension de nanosphères de cyclodextrine jusqu'à un volume de 10 ml, on ajoute
- 20 progressivement à celle-ci des quantités croissantes d'acide chlorydrique (1N) ou de la soude (1N). La suspension de nanosphères est parfaitement stable.

**Exemple 11**

- 25 Stabilité des nanosphères de cycodextrine à la température.

On procède comme indiqué dans l'exemple 1.

- Après concentration de la suspension de nanosphères de cyclodextrine jusqu'à un volume de 10 ml, on place chaque
- 30 lot à 4°C, 25°C et 40°C.

Les suspensions demeurent stables dans le temps et ne présentent, après 14 mois de conservation, ni sédimentation irréversible, ni variation de la taille des nanosphères.

**Exemple 12**

Préparation de nanosphères en présence d'un sel.

On procède comme indiqué dans l'exemple 1, mais la phase aqueuse est additionnée de 90 mg de chlorure de sodium. Après concentration de la suspension de nanoparticules jusqu'à un volume de 10 ml, correspondant compte tenu du chlorure de sodium à l'isotonie avec le sang, les nanosphères ont une taille moyenne de 200 nm avec un indice moyen de dispersion de 1.

La suspension demeure stable dans le temps et ne présente, après 14 mois de conservation, ni sédimentation irréversible, ni variation de la taille des nanoparticules.

**Exemple 13**

Addition de non-solvant dans la phase du solvant.

On procède comme dans l'exemple 1, mais la cyclodextrine est dissoute dans un mélange acétone/eau (90/10, v/v), au lieu d'acétone pure. La présence d'une faible proportion de non-solvant de la cyclodextrine dans un solvant, conduit à des nanosphères dont la taille moyenne est de 180 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,5.

**Exemple 14**

Stabilité des nanosphères de cyclodextrine aux ultrasons.

On procède comme dans l'exemple 1. Après concentration de la suspension de nanosphères de cyclodextrine jusqu'à un volume de 10 ml, on place la suspension de nanosphères de cyclodextrine dans un bain à ultrasons pendant trois heures.

La suspension demeure stable dans le temps et ne présente, après 14 mois de conservation, ni sédimentation

irréversible, ni variation de la taille des nanosphères.

#### Exemple 15

Préparation de nanosphères en présence d'un

5 principe actif lipophile.

On procède comme dans l'exemple 1, mais on ajoute 20 mg d'indométacine dans la phase acétonique. Les nanosphères obtenues ont une taille moyenne de 200 nm avec un indice de dispersion de 0,5. Après ultracentrifugation et dosage  
10 de l'indométacine dans la phase dispersante, la quantité de principe actif incorporé dans les nanosphères représente 70% de la quantité initiale.

#### Exemple 16

15 Préparation de nanosphères contenant de la doxorubicine.

On procède comme dans l'exemple 1, mais on ajoute 5 mg de doxorubicine dans la phase aqueuse. Les nanosphères obtenues ont une taille moyenne de 200 nm et un indice  
20 moyen de dispersion de 1. Après ultracentrifugation et dosage de la doxorubicine dans la phase dispersante, la quantité de principe actif incorporé dans les nanosphères représente 60% de la quantité initiale.

#### Exemple 17

25 Préparation de nanosphères contenant de la progestérone.

On procède comme dans l'exemple 1, mais on ajoute 150 mg de progestérone dans la phase 1. Les nanosphères obtenues  
30 ont une taille moyenne de 120 nm et un indice de dispersion de 0,2. Après ultracentrifugation et dosage de la progestérone dans la phase dispersante, la quantité de principe actif incorporé dans les nanosphères représente 60% de la quantité initiale.

### Exemple 18

Préparation de nanosphères contenant de l'amphotéricine B.

On procède comme dans l'exemple 1, mais on ajoute 6 mg  
5 d'amphotéricine B dans la phase 1. Les nanosphères  
obtenues ont une taille moyenne de 180 nm et un indice  
de dispersion de 0,2. Après ultracentrifugation et dosage  
de l'amphotéricine dans la phase dispersante, la quantité  
de principe actif incorporé dans les nanosphères repré-  
10 sente 90% de la quantité initiale.

### Exemple 19

Préparation de nanosphères contenant un colorant lipophile, le soudan III.

15 On procède comme dans l'exemple 1, mais on ajoute 5 mg  
de soudan III dans la phase 1. Une faible quantité est  
précipitée et reste sur le filtre. Les nanosphères  
obtenues ont une taille moyenne de 130 nm et un indice  
de dispersion de 0,2.

20 Les nanosphères obtenues selon l'invention  
peuvent trouver des applications dans de nombreux  
secteurs techniques.

En tant que "vecteurs" de principe actif, en  
thérapeutique humaine et animale les nanosphères permet-  
25 tent d'envisager :

d'atteindre de nouveaux sites d'action, en  
particulier intracellulaires, voire intralysosomiaux ;

d'utiliser de nouvelles voies d'administra-  
tion pour les principes actifs connus, en augmentant la  
30 stabilité et/ou l'absorption des principes actifs, ou en  
permettant la réalisation de formes injectables par voie  
intravasculaire, de principes actifs insolubles ;

de modifier la distribution tissulaire des  
principes actifs, par un meilleur ciblage vers des sites  
35 d'actions favorables et/ou un détournement des sites

d'effets indésirables voire toxiques (amélioration de l'index thérapeutique).

En pharmacie, ces dispersions colloïdales de cyclodextrine peuvent permettre notamment :

- 5 de réaliser des formes injectables de médicaments insolubles,
- de stabiliser un principe actif médicamenteux.

10 Dans le domaine de la phytopharmacie les nanosphères peuvent véhiculer des insecticides, des pesticides, etc. Leur taille peut permettre d'envisager une action plus puissante par une meilleure pénétration à travers la cuticule. La faible viscosité de la dispersion autorise une pulvérisation très facile sous forme  
15 de gouttelettes de très petite taille plus efficaces car plus couvrantes.

En cosmétologie, les nanosphères de cyclodextrine peuvent transporter des produits anti-radicalaires ou autres au niveau du derme.

20 Dans le domaine des peintures, vernis et traitements des surfaces d'une manière générale, les nanosphères permettent de véhiculer des pigments, des réactifs, des décapants sous forme de dispersion aqueuse de très faible viscosité, aisée à pulvériser ou à  
25 appliquer, et qui peut, si nécessaire, être rendue visqueuse, voire adhésive (remise en suspension des nanosphères dans un véhicule approprié). La taille réduite des nanosphères conduit à une très grande finesse du dépôt et à une très grande homogénéité, par exemple  
30 de pigmentation.

Les nanosphères obtenues selon l'invention peuvent être utilisées dans les domaines de l'imprimerie et de la reprographie, du traitement de surface des textiles et des fibres, ou autre, de la photographie, de  
35 la lubrification, de l'agriculture.



REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un nouveau système colloïdal dispersible à base de cyclodextrine sous forme de nanosphères, caractérisé en ce que

5                   1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de cyclodextrine modifiée par des groupes acyle dans un solvant ou mélange de solvants organique(s) contenant ou non un surfactif et pouvant être additionnée d'une molécule active,

10                   2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par de l'eau ou un mélange aqueux, contenant ou non un surfactif et pouvant être additionnée d'une molécule active, et

15                   3) on ajoute sous agitation modérée, l'une des phases liquides obtenues sous (1) ou (2) à l'autre, de manière à obtenir pratiquement instantanément une suspension colloïdale de nanosphères de cyclodextrine modifiée contenant le cas échéant ladite molécule active.

20                   2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on élimine tout ou partie du solvant ou du mélange de solvants et de l'eau ou du mélange aqueux de manière à obtenir une suspension colloïdale de concentration voulue en nanosphères ou à obtenir un  
25                   poudre de nanosphères.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit solvant de la phase (1) est choisi parmi les alcools et les cétones ou leurs mélanges.

30                   4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la  $\beta$ -cyclodextrine modifiée est une  $\beta$ -cyclodextrine acylée par un groupe acyle aliphatique ou aromatique.

35                   5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la cyclodextrine modifiée est une bêta-

cyclodextrine estérifiée par des groupes alcanoyles de 2 à 20 atomes de carbone.

5 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la cyclodextrine modifiée est une bêta-cyclodextrine estérifiée par des groupes alcanoyles de 6 à 14 atomes de carbone.

10 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la molécule active est un principe actif médicamenteux ou un précurseur médicamenteux à usage humain ou vétérinaire, un réactif biologique ou un principe cosmétique, un virus, un constituant de virus, de bactérie ou de cellule, un antigène, un allergène ou une enzyme.

15 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le rapport des volumes phase (1)/phase (2) est de 0,1 à 1.

9. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la totalité de l'eau est éliminée par lyophilisation.

20 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le(s) surfactif(s) est (sont) présent(s) en une proportion de 0,1 à 10%, de préférence 0,2 à 2% en poids de la suspension colloïdale obtenue dans l'étape 3.

25 11. Utilisation des nanosphères de cyclodextrine modifiée obtenues suivant l'une quelconque des revendications 1 à 10 comme vecteurs de principes actifs médicamenteux ou cosmétiques.

30 12. Utilisation des nanosphères de cyclodextrine modifiée obtenues suivant l'une quelconque des revendications 1 à 10 comme vecteur de produits chimiques.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00594

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. 5 A61K9/51

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. 5 A61K ; B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR,A,2 551 072 (SANDOZ) 1 March 1985 see page 4, line 32 - page 4, line 34 see page 5, line 1-34 see page 6, line 1-6 see page 9, line 24 - page 9, line 34 see page 10, line 21 - page 10, line 31 see page 11, line 18 - page 11, line 23 --	1,2,4-7, 11,12
A	WO,A,8 400 294 (SCHRÖDER) 2 February 1984 see page 3, line 30 - page 3, line 37 see page 4, line 1-38 see page 5, line 1-22 see page 6, line 1-28 see page 8, line 19 - page 8, line 21 --  -/--	1,3,7, 11,12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 August 1993 (31.08.93)

Date of mailing of the international search report

16 September 1993 (16.09.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/FR 93/00594

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EP,A,0 274 961 (CNRS) 20 July 1988 see column 2, line 37 - column 2, line 53. see column 3, line 1-55 see column 4, line 1-44 see column 5, line 10 - column 5, line 14</p> <p style="text-align: center;">--</p> <p style="text-align: center;">-.-.-.-</p>	1-3,9

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300594  
SA 75469

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

31/08/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2551072	01-03-85	CH-A- 656884	31-07-86
		AT-B- 395584	25-01-93
		AU-B- 575066	21-07-88
		AU-A- 3234884	28-02-85
		BE-A- 900406	22-02-85
		DE-A- 3430852	14-03-85
		GB-A, B 2145422	27-03-85
		JP-A- 60076531	01-05-85
		LU-A- 85514	24-04-85
		NL-A- 8402547	18-03-85
		SE-B- 462098	07-05-90
		SE-A- 8404225	27-02-85
WO-A-8400294	02-02-84	AU-B- 567434	19-11-87
		AU-A- 1776083	08-02-84
		DE-A- 3376797	07-07-88
		EP-A, B 0113749	25-07-84
		US-A- 4713249	15-12-87
EP-A-0274961	20-07-88	FR-A- 2608942	01-07-88
		DE-A- 3777793	30-04-92
		JP-A- 63232840	28-09-88
		US-A- 5049322	17-09-91
		US-A- 5174930	29-12-92

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 A61K9/51		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	A61K ; B01J	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>9</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
X	FR,A,2 551 072 (SANDOZ) 1 Mars 1985 voir page 4, ligne 32 - page 4, ligne 34 voir page 5, ligne 1-34 voir page 6, ligne 1-6 voir page 9, ligne 24 - page 9, ligne 34 voir page 10, ligne 21 - page 10, ligne 31 voir page 11, ligne 18 - page 11, ligne 23 ---	1, 2, 4-7, 11, 12
A	WO,A,8 400 294 (SCHRÖDER) 2 Février 1984 voir page 3, ligne 30 - page 3, ligne 37 voir page 4, ligne 1-38 voir page 5, ligne 1-22 voir page 6, ligne 1-28 voir page 8, ligne 19 - page 8, ligne 21 --- -/-	1, 3, 7, 11, 12
<p><sup>9</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup></p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
31 AOUT 1993 31 1993		16.09.93
Administration chargée de la recherche internationale		Signature du fonctionnaire autorisé
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		MEERTENS J.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>			(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)	
Catégorie °	Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>		
A	EP,A,0 274 961 (CNRS) 20 Juillet 1988 voir colonne 2, ligne 37 - colonne 2, ligne 53 voir colonne 3, ligne 1-55 voir colonne 4, ligne 1-44 voir colonne 5, ligne 10 - colonne 5, ligne 14 -----	1-3,9		

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300594  
SA 75469

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

31/08/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2551072	01-03-85	CH-A- 656884	31-07-86
		AT-B- 395584	25-01-93
		AU-B- 575066	21-07-88
		AU-A- 3234884	28-02-85
		BE-A- 900406	22-02-85
		DE-A- 3430852	14-03-85
		GB-A,B 2145422	27-03-85
		JP-A- 60076531	01-05-85
		LU-A- 85514	24-04-85
		NL-A- 8402547	18-03-85
		SE-B- 462098	07-05-90
		SE-A- 8404225	27-02-85
WO-A-8400294	02-02-84	AU-B- 567434	19-11-87
		AU-A- 1776083	08-02-84
		DE-A- 3376797	07-07-88
		EP-A,B 0113749	25-07-84
		US-A- 4713249	15-12-87
EP-A-0274961	20-07-88	FR-A- 2608942	01-07-88
		DE-A- 3777793	30-04-92
		JP-A- 63232840	28-09-88
		US-A- 5049322	17-09-91
		US-A- 5174930	29-12-92

EPO FORM P0472